

199498

P. 9244.-

Case 3252.

199498



- 7 SEP. 1951

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana,
establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva
Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA RECUPERAR VITAMINA B₁₂ DESDE
"SOLUCIONES ACUOSAS".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

Esta solicitud se refiere a la vitamina B₁₂
y más particularmente a complejos de sal metálica y vitamina
B₁₂ y a un método de utilizar estos productos para recuperar



vitamina B₁₂ de concentrados que contienen impurezas asociadas.

De acuerdo con el presente invento, un complejo de cianuro metálico y vitamina B₁₂ es precipitado desde una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂, siendo el cianuro metálico cianuro de cobre, de cobalto, de níquel, de zinc o de plata.

La vitamina B₁₂ que terapéuticamente es la sustancia más potente que se haya descubierto, se obtiene comercialmente desde caldos de fermentación de los cuales se aísla en cantidades extremadamente pequeñas. Desgraciadamente, el procedimiento de recuperar vitamina B₁₂ se complica por la presencia de diversas sustancias contaminantes que, debido a sus características similares de solubilidad, son difíciles de separar de la vitamina. Por consiguiente, se ha considerado anteriormente necesario someter un concentrado que contiene vitamina B₁₂ a un procedimiento de purificación cromatográfica sobre un adsorbente tal como alúmina activada o carbón vegetal activado para separar estas impurezas y recuperar la vitamina B₁₂. Sin embargo, tales procedimientos son difíciles de realizar en gran escala y, por consiguiente, es muy deseable encontrar un medio de evitar los procedimientos cromatográficos.

El presente invento se refiere a ciertos complejos de sal metálica y vitamina B₁₂, a métodos de preparar estos productos y a un procedimiento para utilizar estos complejos como medio de separar vitamina B₁₂



de impurezas asociadas.

Un objeto del invento es el de crear nuevas composiciones de materia que comprenden complejos insolubles en agua de sal de metal pesado que contienen vitamina B₁₂. Otro objeto es el de crear un procedimiento por el cual estos nuevas complejos que contienen vitamina B₁₂ pueden ser obtenidos. Otro objeto es el de crear un procedimiento por el cual las nuevas composiciones del invento pueden utilizarse para separar vitamina B₁₂ de las impurezas asociadas con ella en concentrados de la vitamina, tal como los obtenidos de caldos de fermentación.

De acuerdo con el invento, se ha comprobado que cuando ciertas sales insolubles en agua de metales pesados se forman en una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂, la vitamina B₁₂ es precipitada con la sal metálica. Estas sales metálicas precipitadas que contienen vitamina B₁₂ parecen tener la naturaleza de complejos en los cuales la vitamina está combinada con la sal metálica en algún modo que no se comprende por complejo en la actualidad. El producto del complejo insoluble se separa de la solución por operaciones convencionales tales como filtración o centrifugación. Del producto así aislado, la vitamina B₁₂ se recupera luego fácilmente por métodos que luego se describen en detalle.

De acuerdo con una realización específica del invento, hemos comprobado que estos complejos insolubles de sal metálica y vitamina B₁₂ proporcionan un medio



conveniente y sencillo para recuperar vitamina B₁₂ de concentrados de la misma en los cuales hay diversas impurezas asociadas con dicha vitamina. Así, disolviendo un concentrado que contiene vitamina B₁₂ en agua y precipitando una sal de metal pesado en ella, la vitamina es precipitada con la sal y la masa de las impurezas asociadas permanece en solución. El procedimiento de este invento crea por tanto un medio conveniente y simple de purificar concentrados que contienen vitamina B₁₂ y de aislar este importante producto.

En general, hemos comprobado que las sales insolubles en agua de los metales pesados tales como los cianuros de cobre, cobalto, níquel, cinc y plata, los tiocianatos de cobre y de plata, los yoduros de plata y de plomo, y el bromuro, triyoduro y cianato de plata, son útiles para la realización del procedimiento del invento. En la práctica, el procedimiento se efectúa precipitando estas sales de metales pesados en una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂, precipitando así al mismo tiempo la vitamina y la sal metálica insoluble. Por ejemplo, un concentrado impuro que contiene una pequeña cantidad de vitamina B₁₂ se disuelve en agua, y se añaden a ella una sal acuosa soluble del metal pesado, y una sal acuosa soluble del anión deseado, determinando la precipitación de la sal de metal pesado que contiene la vitamina B₁₂ co-precipitada. El producto precipitado se retira de la solución y la vitamina B₁₂ se aísla de este producto por métodos que se describen luego con más detalle.



De acuerdo con una realización preferida del invento, hemos comprobado que los cianuros de metales pesados son particularmente útiles en el procedimiento del invento. El uso de estas sales insolubles permite la recuperación de, virtualmente, toda la vitamina B_{12} . Además, la vitamina B_{12} es aislada con facilidad de los cianuros de metal pesado precipitados. Aún cuando se obtienen resultados satisfactorios con todos los cianuros de metales pesados antes mencionados, hemos comprobado que el uso de cianuros de cobre y de cinc es particularmente ventajoso. Al efectuar el aislamiento de la vitamina B_{12} de concentrados por medio del complejo de cianuro de cobre, el concentrado se disuelve en agua a la cual se añade luego una fuente de iones de cobre y cianuro que dan como resultado la formación y precipitación del complejo de cianuro de cobre y vitamina B_{12} . En la práctica real, encontramos que la vitamina B_{12} se precipita del modo más completo cuando es empleado un gran exceso de cianuro de cobre. La cantidad óptima de cianuro de cobre a añadir dependerá, por supuesto, de la concentración y pureza de la solución desde la cual ha de recuperarse la vitamina B_{12} . En general, encontramos que cuando la concentración de vitamina B_{12} es muy baja, por ejemplo, de 1% o menos, es deseable añadir un exceso de varios cientos de veces de iones de cobre y cianuro por mol de vitamina B_{12} . Con concentrados que contienen como 5% de vitamina B_{12} , se añade una cantidad suficiente de iones de cobre y cianuro a la solución para formar como

199498



150 moles de cianuro cúprico por mol de vitamina B₁₂.
Además, a fin de asegurar una recuperación óptima de vitamina B₁₂, encontramos que es deseable tener un exceso de iones de cobre en la solución acuosa, con preferencia un
5 exceso de aproximadamente 100%.

El contenido máximo de vitamina B₁₂ de un concentrado puede determinarse convenientemente midiendo la densidad óptica de una muestra empleando luz de 5500 Å de longitud de onda que es una de las crestas características de absorción para la vitamina B₁₂ pura, y comparando el valor obtenido con la densidad óptica de la vitamina B₁₂ pura (E^{1%}_{1cm} = 63). El valor así obtenido se convierte en un valor molecular empleando 1350 como peso molecular aproximado de la vitamina B₁₂.

15 Al llevar a la práctica el procedimiento de esta realización del invento, puede emplearse cualquier fuente conveniente de iones de cobre y cianuro. En general, encontramos de la máxima conveniencia usar un cianuro de metal alcalino como fuente de iones de cianuro y una sal
20 de cobre soluble tal como sulfato de cobre como fuente de los iones de cobre. Pueden utilizarse otras fuentes de estos iones que serán evidentes a los técnicos.

La vitamina B₁₂ puede recuperarse del complejo precipitado de cianuro de cobre y vitamina B₁₂ por
25 cualquiera de varios métodos convenientes. Uno de tales procedimientos comprende añadir una solución acuosa que contiene iones de cianuro en cantidad suficiente para di-

199498



- 7 -

solver todo el complejo de cianuro de cobre. La vitamina B_{12} se separa luego de esta solución por extracción con un disolvente orgánico inmiscible, en el cual el complejo de cianuro y vitamina B_{12} formado sea fácilmente soluble, tal como butanol, alcohol bencílico, una mezcla de cresol y tetracloruro de carbono, y similares. Otro procedimiento de separar la vitamina B_{12} del producto precipitado comprende poner en íntimo contacto el precipitado con un ácido acuoso, tal como una solución de ácido acético o ácido clorhídrico. Estas soluciones ácidas disuelven la vitamina B_{12} que pueden luego aislarse desde la solución acidificada per extracción con un disolvente orgánico inmiscible del tipo antes mencionado. Alternativamente, la vitamina B_{12} puede recuperarse desde el complejo de cianuro de cobre y vitamina B_{12} por extracción directa con un disolvente orgánico conveniente, tal como cresol o alcohol bencílico. La vitamina B_{12} es recuperada entonces de los extractos resultantes en disolvente por procedimientos convencionales.

Quando la vitamina B_{12} recuperada del complejo precipitado de cianuro de cobre y vitamina B_{12} contiene todavía una cantidad considerable de impurezas, como puede ocurrir cuando el concentrado de partida es muy impuro, puede ser deseable someter el producto recuperado a un segundo proceso de purificación por precipitación de la vitamina B_{12} como complejo con cianuro de cobre, de nuevo.

En una forma similar, pueden utilizarse los cianuros de cinc, cobalto, níquel y plata, en lugar de los



-7SE

cianuros de cobre, para efectuar el aislamiento de vitamina B₁₂ desde concentrados de la misma.

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar realizaciones específicas del invento.

5 Ejemplo 1

Un concentrado sólido de vitamina B₁₂ que pesaba 1,3 grs. y que contenía 155 mgrs. (11,9%) de vitamina B₁₂ potencial, se disolvió en 100 mls. de agua. Este concentrado de vitamina B₁₂ se obtuvo de un caldo de fermentación preparado por cultivo de una cepa de S. griseus. A esta solución se añadieron 31 mls. de una solución acuosa 1M de cianuro sódico y 31 mls. de una solución acuosa 1M de sulfato cúprico. Se formó inmediatamente un precipitado del complejo de cianuro de cobre-vitamina B₁₂.

15 El precipitado se separó por filtración, se lavó con 30 mls. de agua, y luego se lavó con 100 mls. de ácido acético acuoso al 15%. El precipitado se extrajo con un total de 400 mls. de ácido acético acuoso 50% (puede emplearse un volumen mayor de ácido más diluido).
20 Los extractos se diluyeron luego con 1.100 mls. de agua. Esta solución se extrajo con 650 mls. de una mezcla al 1:1 de cresol y tetracloruro de carbono. Al extracto en el disolvente se le añadió 1 volumen de acetona y 2 volúmenes de éter. Se formó un precipitado y se retiró por
25 filtración. El precipitado se disolvió en 130 mls. de metanol, y se añadieron 1.000 mls. de éter. Se formó un precipitado y se separó por filtración. El precipitado pesó

199498



380 mgrs. y resultó contener 140 mgrs. (36,8%) de vitamina B₁₂ potencial.

Los 380 mgrs. de precipitado se disolvieron en 100 mls. de agua y se añadieron 28 mls. de solución acuosa 1M de cianuro sódico y 28 mls. de solución acuosa 1M de sulfato cúprico. Se formó un precipitado, se lavó con 20 mls. de agua y se lavó luego con 50 mls. de ácido acético acuoso al 10%. El precipitado se extrajo con un total de 200 mls. de ácido acético acuoso al 50% y luego se lavó con 20 mls. de agua. Los extractos y las lavaduras se diluyeron luego a 1.000 mls. con agua. Esta solución se extrajo con 500 mls. de mezcla al 1:1 de cresol y tetracloruro de carbono. Al extracto se le añadieron 1 volumen de acetona y 3 volúmenes de éter. Se formó un precipitado, se retiró, y se disolvió en 170 mls. de metanol y se añadieron 1.700 mls. de éter. Se formó un precipitado y se retiró por filtración. El precipitado pesó 247 mgrs. y resultó contener 130 mgrs. (52,7%) de vitamina B₁₂ potencial.

El precipitado de 247 mgrs. se disolvió en 0,3 mls. de agua. La solución se dejó reposar durante la noche. Los cristales que se formaron se retiraron por filtración y se lavaron con 0,5 mls. de agua fría (0°C). El filtrado y la lavadura resultaron contener 24 mgrs. de vitamina B₁₂ potencial. Los cristales se disolvieron en 9,5 mls. de agua, y la solución se diluyó con 110 mls. de acetona. Al enfriar a 0°C, y dejar reposar, se formaron



crisales. Los crisales se retiraron por filtración y se secaron. Los crisales pesaron 103,3 mgrs. y eran vitamina B₁₂ con una pureza de 95-98%.

Ejemplo 2.

5 A 100 mls. de un concentrado acuoso de B₁₂ obtenido por el procedimiento de recuperar vitamina B₁₂ de caldo de fermentación de S. griseus y que contenía unos 30-40 mgrs. de vitamina B₁₂, se añadieron 50 mls. de solución acuosa 2M de cloruro de cinc y 50 mls. de solución acuosa 1M de cianuro potásico. Se formó inmediatamente
10 un precipitado del complejo cianuro de cinc-vitamina B₁₂.

El precipitado se separó por filtración, se lavó con agua, y se extrajo luego con 660 mls. de ácido clorhídrico acuoso 0,25N. La solución ácida se extrajo sucesivamente con 132 mls. y 60 mls. de una mezcla 1-1
15 (un sistema de tres fases líquidas) de cresol y éter de petróleo (30-60°). Los extractos en disolvente combinados se lavaron con unos 500 mls. de agua. A los extractos se les añadieron 190 mls. de agua, y se adicionaron 95 mls. de n-butanol, lo cual combinó los disolventes en una fase
20 y transfirió el material activo a la capa acuosa. Después de separar las dos fases, la fase disolvente se extrajo varias veces con agua, dando un total de 180 mls. Los extractos en agua se combinaron, se concentraron a un pequeño volumen, y se añadió acetona para precipitar el
25 material activo. El examen del precipitado indicó que se había efectuado una purificación sustancial y que la vitamina B₁₂ se había recuperado con buen rendimiento.

199498-7 SEP



Ejemplo 3.

Concentrados acuosos adicionales de vitamina B_{12} de los tipos descritos en los ejemplos 1 y 2 se purificaron empleando precipitaciones con cianuro cobaltoso, cianuro de níquel y cianuro de plata. En cada caso, un cianuro acuoso soluble, tal como cianuro potásico, se añadió primero a la solución que contenía la vitamina B_{12} , y luego se añadió una sal acuoso soluble del metal empleado, tal como un nitrato. Las cantidades de sal metálica y cianuro empleadas fueron del mismo orden que las mostradas en los ejemplos 1 y 2. Después de cada precipitación, virtualmente la totalidad de la vitamina B_{12} potencial se encontró había sido separada de la solución.

Los precipitados fueron retirados en cada caso por filtración, empleando tierra de diatomeas como auxiliar de la filtración. Al extraer las tortas del filtro con hidróxido amónico (se empleó una concentración 1-6N), los extractos resultaron contener virtualmente toda la vitamina potencial B_{12} en todos los casos. Las soluciones alcalinas se ajustaron a pH 7 y luego se extractaron con cresol-tetracloruro de carbono y se precipitaron como se ha descrito en el ejemplo 1. En cada caso se había efectuado una purificación significativa, comparable a la obtenida por precipitación del complejo cianuro de cobre-vitamina B_{12} , con poca pérdida aparente de vitamina B_{12} .

En el invento pueden hacerse diversos cambios y modificaciones, del cual se han descrito en esta Memoria



ciertas realizaciones preferidas, sin apartarse de su alcance. Nuestra intención es que tales cambios y modificaciones, en la medida en que quedan dentro del alcance de las reivindicaciones anejas, se interpreten como parte del invento.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 8 de Septiembre de 1950 bajo el número 183.909, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1º. - El procedimiento que comprende precipitar un complejo de cianuro metálico-vitamina B₁₂ de una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂, siendo dicho cianuro metálico cianuro de cobre, cobalto, de níquel, de cinc o de plata.

2º. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1, en el cual la solución acuosa contiene impurezas.

3º. - El procedimiento según se reivindica



en los puntos 1 o 2, que incluye separar el complejo insoluble de cianuro metálico-vitamina B₁₂, y recuperar vitamina B₁₂ del complejo.

5 4º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 3, en el cual la solución acuosa contiene un concentrado impuro de vitamina B₁₂.

10 5º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 4, en el cual se forma cianuro de cobre en la solución que contiene vitamina B₁₂ precipitando con ello un complejo de cianuro de cobre-vitamina B₁₂.

15 6º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 4, en el cual se forma cianuro de cinc en la solución que contiene vitamina B₁₂ precipitando con ello un complejo de cianuro de cinc-vitamina B₁₂.

7º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 6, en el cual se recupera vitamina B₁₂ en forma virtualmente pura.

20 8º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 5 y 7, en el cual se precipita un complejo de cianuro de cobre-vitamina B₁₂ desde una solución acuosa de un concentrado que contiene vitamina B₁₂, se pone en íntimo contacto el complejo precipitado con una solución ácida acuosa para extraer la vitamina
25 B₁₂, se extrae dicha solución acuosa ácida con un disolvente inmiscible con agua, y se recupera vitamina B₁₂ del disolvente inmiscible separado.

199498



1951

5 9^a. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 4, 6 y 7, en el cual un complejo de cianuro de cinc-vitamina B₁₂ se precipita desde una solución acuosa de un concentrado que contiene vitamina B₁₂, se pone en íntimo contacto el complejo precipitado con una solución ácida acuosa para extraer la vitamina B₁₂, se extracta dicha solución ácida acuosa con un disolvente inmiscible con agua, y se recupera vitamina B₁₂ del disolvente inmiscible separado.

10 10^a. - Un procedimiento para recuperar vitamina B₁₂ desde soluciones acuosas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

15 Esta Memoria consta de catorce hojas escritas por una sola cara.

- 7 SEP. 1951

Madrid,

P. A.
Alberto de Elizaburu
San Pedro